



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101308137 B

(45) 授权公告日 2012.09.12

(21) 申请号 200710028003.6

审查员 李煦颖

(22) 申请日 2007.05.15

(73) 专利权人 广东省疾病预防控制中心

地址 510300 广东省广州市海珠区新港西路
176 号

(72) 发明人 江立敏 周惠琼 郑夔 柯昌文

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 刘孟斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

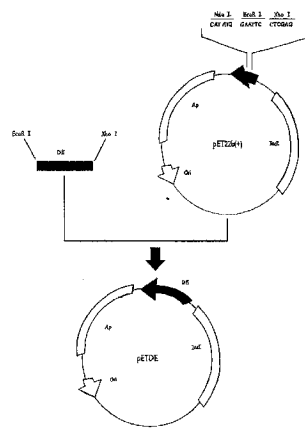
权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 2 页

(54) 发明名称

登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒。本发明所述的试剂盒包括酶标记板、阴性对照血清、阳性对照血清、酶标记物、样品稀释液、浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、封板胶,所述酶标记物包含羊抗人 IgG-HRP;所述酶标记板上的包被抗原包括:氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的重组 1 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQID No. 3 的重组 2 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 5 的重组 3 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 7 的重组 4 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原。通过检测血清中登革病毒 IgG 抗体,可对二次或以上多次感染登革热的病人进行早期诊断和对健康人群的血清流行病学调查。并可对初次感染登革热的病人进行最后确诊。



1. 一种登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒,包括酶标记板、阴性对照血清、阳性对照血清、酶标记物、样品稀释液、浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、封板胶,其特征在于:

所述酶标记物包含羊抗人 IgG - HRP,即羊抗人 IgG - 辣根过氧化物酶;

所述酶标记板上的包被抗原为基因工程重组表达的登革病毒包膜蛋白特异性抗原,所述抗原包括:氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的重组 1 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的重组 2 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 5 的重组 3 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;以及氨基酸序列为 SEQ ID No. 7 的重组 4 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;

所述的阳性对照血清是在含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,加入确定浓度的阳性血清制成,阳性对照的 A 值应大于 1.5;

阴性对照血清是在含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,按 5% 的比例加入混合好的阴性血清制成,阴性对照的 A 值应小于 0.1。

2. 根据权利要求 1 所述的登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒,其特征在于:

所述重组 1 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 2 的 DNA 序列所编码的;

所述重组 2 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 4 的 DNA 序列所编码的;

所述重组 3 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 6 的 DNA 序列所编码的;

所述重组 4 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 8 的 DNA 序列所编码的。

3. 根据权利要求 1 所述的登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒,其特征在于:所述酶标记板的制备方法是:将所述的基因工程重组表达的登革病毒包膜蛋白特异性抗原按确定的浓度用 0.05M 的 pH9.6 的 CB 即碳酸盐缓冲液稀释后,按 0.1ml/孔包被到微孔板内,在 2°C~8°C 吸附 24~26 小时后,用 10mM PBST 即吐温磷酸缓冲液按 0.25ml/孔洗板,再用封闭液按 0.15ml/孔在 2°C~8°C 封闭 18~20 小时,弃除多余的封闭液,经真空干燥处理后用铝膜袋密封,置 2~8°C 保存。

4. 根据权利要求 3 所述的登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒,其特征在于:所述的封闭液的组成为:含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 即磷酸缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒,其特征在于:所述的所述酶标记物是用酶标稀释液按工作浓度配制的羊抗人 IgG - HRP 工作液,所述的酶标稀释液的组成为:pH7.4 的 10mM 磷酸缓冲液即 PBS,其中含 10% 山羊血清、0.2% 吐温-20 和 0.02% 叠氮钠。

登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种酶联免疫诊断试剂盒,尤其是涉及一种登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒。

背景技术

[0002] 登革热 (Dengue Fever, DF) 是由 4 个血清型登革病毒 (Dengue Virus, DV) 引起的急性蚊媒传染病,主要通过埃及伊蚊或白纹伊蚊叮咬传播。登革病毒属于黄病毒科 (Flaviviridae),黄病毒属 (Flavivirus)。DF 是分布最广,发病最多,危害较大的一种虫媒病毒性疾病,广泛流行于全球热带和亚热带的非洲、美洲、东南亚和西太平洋区的 100 多个国家和地区。据 WHO 估计全球约有 25 亿人口的健康受到威胁,每年有 5000 万人感染登革病毒。随着全球气候变暖日趋严重,登革热地理分布上有蔓延的趋势,发病率和疫情的严重程度也有所增加,登革热已成为全球性的严重公共卫生问题。

[0003] 登革热在我国经过了 30 多年静止期后,1978 年广东佛山突然发生流行,自此,登革热一直是广东省重点防治的传染病。登革热疫情来势急,扩散快,不容易控制,对人民的生命健康产生巨大威胁、对地方经济发展产生极大影响,因而成为一项重大的公共卫生问题。登革热疑似病例的尽快确诊可帮助及早发现疫情,尽快采取措施,在最小范围控制疫情,因而把损失减到最少。目前我国对登革热的实验室诊断主要依靠进口的酶联免疫试剂,其价格昂贵,在基层医院及市、县级疾控中心难于普及,另外,进口试剂采购到货时间长,实验室有时未能及时拿到试剂,而延误诊断。首发病人往往由于误诊,没有及时采取有效措施,而导致登革热疫情蔓延。每宗疫情在其发现时已陷入十分紧张和被动的局面,进而花费巨大的人力物力去控制。因此,开发出简便、快速、经济、适宜于基层单位推广使用的登革热诊断试剂成为登革热疫情控制中急需解决的难题。

[0004] 人感染了登革病毒后,一般经过 3~10 天(通常 4~5 天)的潜伏期后,受感染者会出现以发热、疼痛为主要症状的登革热,同时,机体的免疫系统会产生一系列的免疫应答反应,初次感染登革病毒,机体产生抗体的速度较慢,滴度也较低,IgM 为最初应答的抗体。IgG 在发病的第一周末才出现,滴度很低,上升速度也慢。根据泛美卫生组织标准,到发病的第五天,80%可查到检测水平的 IgM,发病的第 6-10 天,93-99%可查到检测水平的 IgM,IgM 可持续存在 90 天以上。二次感染登革病毒的病人,由于 IgM 抗体远低于初次感染产生的抗体水平,约有 20~30%的病人在二次感染登革病毒后的第 10 天未能检测到 IgM 抗体;而 IgG 抗体发病后 1~2 天可迅速上升到远远高于初次感染产生抗体的水平,故可以通过检测登革病毒 IgG 抗体对二次感染登革的病人进行诊断,并根据抗体滴度高低对近期感染或继往感染进行判断,IgG 抗体可以终生维持。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒,通过检测血清中登革病毒 IgG 抗体,可对二次或以上多次感染登革热的病人进行早期诊断和对健康人

群的血清流行病学调查,并可对初次感染登革热的病人进行最后确诊(双份血清特异性 IgG 抗体出现 4 倍或超过 4 倍的增长)。

[0006] 本发明所述的一种登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒,包括酶标记板、阴性对照血清、阳性对照血清、酶标记物、样品稀释液、浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、封板胶,所述酶标记物包含羊抗人 IgG-HRP,即羊抗人 IgG-辣根过氧化物酶;所述酶标记板上的包被抗原为基因工程重组表达的登革病毒包膜蛋白特异性抗原,所述抗原包括:氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的重组 1 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的重组 2 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 5 的重组 3 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原;氨基酸序列为 SEQ ID No. 7 的重组 4 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原。

[0007] 所述重组 1 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 2 的 DNA 序列所编码的;所述重组 2 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 4 的 DNA 序列所编码的;所述重组 3 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 6 的 DNA 序列所编码的;所述重组 4 型登革病毒包膜蛋白特异性抗原是由 SEQ ID No. 8 的 DNA 序列所编码的。

[0008] 所述的阳性对照血清是在含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,加入确定浓度的阳性血清制成,阳性对照的 A 值应大于 1.5;阴性对照血清是在含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,按 5% 的比例加入混合好的阴性血清制成,阴性对照的 A 值应小于 0.1。

[0009] 所述酶标记板的制备方法是:将所述的基因工程重组表达的登革病毒包膜蛋白特异性抗原按确定的浓度用 0.05M 的 pH9.6 的 CP 即碳酸盐缓冲液稀释后,按 0.1ml/孔包被到微孔板内,在 2°C~8°C 吸附 24~26 小时后,用 10mM PBST 即吐温磷酸缓冲液按 0.25ml/孔洗板,再用封闭液按 0.15ml/孔在 2°C~8°C 封闭 18~20 小时,弃除多余的封闭液,经真空干燥处理用铝膜袋密封,置 2~8°C 保存。

[0010] 所述的封闭液的组成为:含 20% 山羊血清和 0.02% 叠氮钠的 pH7.4 的 10mM 磷酸缓冲液即 PBS。

[0011] 所述的酶标记物是用酶标稀释液按工作浓度配制的羊抗人 IgG-HRP 工作液,所述的酶标稀释液的组成为:pH7.4 的 10mM PBS 即磷酸缓冲液,其中含 10% 山羊血清、0.2% 吐温-20 和 0.02% 叠氮钠。

[0012] 登革病毒为单股正链 RNA 病毒,长度约为 11Kb,编码 3400 个氨基酸,分子量为 4200KDa。基因组含有一个长的开放读码框架,编码病毒的全部蛋白:包括 3 种结构蛋白和 7 个非结构(NS)蛋白。其中 E 结构蛋白是一种包膜糖蛋白,亚群特异和型特异的抗原决定簇及中和、血凝抑制作用的主要抗原表位均位于包膜蛋白 E 上,因此 E 结构蛋白对病原诊断具有重要意义。

[0013] 本发明所述的登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒采用重组登革病毒 1-4 型 E 蛋白 B 区的型特异性抗原(约 120 个氨基酸),避免与黄热病毒、乙型脑炎病毒抗原产生交叉反应。国外商品化登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂多采用纯化的全病毒抗原,这些试剂缺点是本底高,与黄病毒科病毒存在交叉反应,最常见者为乙型脑炎病毒与黄热病毒。本发明研制的试剂盒克服了国外试剂的缺点。

[0014] 与国内外同类产品比较

[0015] 在国内尚无检测登革病毒抗体的酶免试剂。在国外,常用的登革热酶联免疫诊断试剂全部采用细胞培养后纯化的全病毒抗原。如目前唯一获得美国 FDA 批准文号的澳大利亚 PanBio 公司生产的 Dengue IgG ELISA 诊断试剂盒,其不是在于本底高,因而需要借助酶标比色仪检测,阈值 (cut-off 值) 为 0.4-0.65,与黄病毒科病毒如乙型脑炎病毒存在交叉反应。本发明制备的登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂是间接法 IgG-ELISA,方法简便、易操作,灵敏性高,与黄热病毒、乙型脑炎病毒抗原不产生交叉反应。

[0016] 本发明的研究成果填补了我国登革热诊断试剂的空白,为我国登革热的临床诊断、血清学监测和流行病学调查提供了新的技术手段,具有广泛的推广应用前景。

附图说明

[0017] 图 1 为表达质粒的构建示意图。

[0018] 图 2 为登革重组抗原纯化过程 SDS-PAGE 蛋白电泳图谱;1:蛋白标准 P7708V;2:超声后离心的上清;3:亲和层析纯化的蛋白;4:阳离子交换纯化的蛋白;5:分子筛纯化的蛋白。

[0019] 图 3 为重组蛋白 Western Blot 鉴定结果;M:蛋白质 marker P7708V;1-3:WB 反应带;4:阴性对照。

具体实施方式

[0020] 实施例一:登革抗原的克隆、表达和纯化

[0021] (一) 材料

[0022] 1. 标准毒株:登革 1 型 (Hawaii 株),简称 D1;登革 2 型 (NGC 株),简称 D2;登革 3 型 (H87 株),简称 D3;登革 4 型 (H241 株),简称 D4;购自中国药品生物制品检定所,由广东省疾病预防控制中心保存。

[0023] 2. 质粒:克隆载体 BM13 质粒购自 TaKaRa 公司,表达质粒 pET22b(+) 是 Novagen 产品。由广东省疾病预防控制中心微生物检验所保存。

[0024] 3. 菌株:受体菌 *E. coli* TOP10F' 和表达用的大肠杆菌 BL21 Star™(DE3) 购自 Invitrogen 公司,由广东省疾病预防控制中心微生物检验所保存。

[0025] 4. 酶类:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 分别购自 New-England、Invitrogen、BOEHRINGER MANNHEIM 以及大连宝生物工程有限公司等。5. 其它试剂:Yeast Extract(酵母粉)、TRYPTONE(蛋白胨)和 IPTG 诱导剂是 BBI 产品,购自上海生物工程有限公司。

[0026] (二) 方法

[0027] 1. 病毒 RNA 的提取及 cDNA 合成

[0028] 采用 QIAGEN 公司 QIAamp Viral RNA mini Kit。按试剂盒要求,提取病毒 RNA,以随机引物逆转录合成 cDNA。

[0029] 2. PCR 扩增基因

[0030] 参照上述登革病毒 1-4 型毒株的包膜蛋白基因序列(来自 Genbank),设计引物,在引物的 5' 端加上 EcoRI 酶切位点,在引物的 3' 端加上 XhoI 酶切位点,以利于克隆入表达载体。

[0031] 针对登革 1 型包膜蛋白基因的引物为：

[0032] D1E-F： 5' -GGAGGAATTCAAAATGGACAAACTGACTCT-3'

[0033] D1E-R： 5' -CCCACCTCGAGACGACGTGCACCACGGGCAGTCGC-3'

[0034] 针对登革 2 型包膜蛋白基因的引物为：

[0035] D2E-F： 5' -GGAGGAATTCCGTATGGACAAACTACAGCT-3'

[0036] D2E-R： 5' -CCCACCTCGAGACGCTTCGCACCACGCATTGTTGT-3'

[0037] 针对登革 3 型包膜蛋白基因的引物为：

[0038] D3E-F： 5' -GGAGGAATTCAAGATGGACAAATTGAAACT-3'

[0039] D3E-R： 5' -CCCACCTCGAGACGACGTGCACCACGGGCAGTGGC-3'

[0040] 针对登革 4 型包膜蛋白基因的引物为：

[0041] D4E-F： 5' -GGAGGAATTCCGTATGGAGAAATTGCGTATTAAGG-3'

[0042] D4E-R： 5' -CCCACCTCGAGACGCTTTGCGCCACGGTATGTGGA-3'

[0043] . 循环程序为：用 Invitrogen 高保真酶，95℃ 15 分钟热起动，94℃ 变性 15s，55℃ 退火 30s，68℃ 延伸 1min，共 22 个循环，68℃ 再作用 5min，冷却至 4℃。

[0044] 3. PCR 片段的纯化与回收

[0045] 采用 QIAGEN Gel Extraction Kit 纯化 PCR 片段。

[0046] 4. 基因的克隆

[0047] 基本操作参照《Molecular Cloning》(Sambrook et al., 1989) 进行。包括酶切和连接；质粒 DNA 的转化、重组质粒的筛选及重组质粒的鉴定。克隆的基因片段经序列测定确认。将纯化的 PCR 片段先克隆在 BM13 质粒上测片段核苷酸序列，重组表达登革 1-4 型包膜蛋白抗原 (E) 分别表示为 D1E-D4E，其中，D1E-D3E 序列为 372 个核苷酸，编码 124 个氨基酸，D4E 序列 369 个核苷酸，编码 123 个氨基酸，具体序列如下：

[0048] D1E 的核苷酸及氨基酸序列 (372 个核苷酸，编码 124 个氨基酸)

[0049] 核苷酸序列 (SEQ ID No. 2)

[0050] AAAATGGACAAACTGACTCTAAAAGGGATGTCATATGTTATGTGCACAGGCTCATTCAAGCTAGAGAAA
GAAGTGGCTGA

[0051] GACCCAACATGGAACCGTTCTAGTGCAGATTAATAACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTT
TTCGACCCAAG

[0052] ATGAAAGAGGAGTAACCCAGAACGGGAGATTAATAACAGCCAACCCTATAGTTACTGACAAAGAAAAAC
CAGTCAACATT

[0053] GAGGCAGAACACCTTTTGGTGAGAGTTACATCGTGATAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGT
TGGTTCAAGAA

[0054] AGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTTGAGGCGACTGCCCGTGGTGCACGTCGT

[0055] 氨基酸序列 (SEQ ID No. 1)

[0056] KMDKLTCLKGMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQIKYEGTDAPCKIPFSTQDERGVTQNGRLITANP
IVTDKEKPVNI

[0057] EAEPFPGESYIVIGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMFATARGARR

[0058] D2E 的核苷酸及氨基酸序列 (372 个核苷酸，编码 124 个氨基酸)

[0059] 核苷酸序列 (SEQ ID No. 4)

- [0060] CGTATGGACAAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAAAGTTGTGAAG
GAAATAGCAGA
- [0061] AACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCATGTAAGATCCCTTT
TGAGATAATGG
- [0062] ATTTGGAAAAAAGACATGTTTTAGGTGCGCTGATTACAGTCAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCC
CAGTCAACATA
- [0063] GAAGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAGCTCAAC
TGGTTTAAGAA
- [0064] AGGAAGTTCTATCGGCCAAATGATTGAGACAACAATGCGTGGTGCGAAGCGT
- [0065] 氨基酸序列 (SEQ ID No. 3)
- [0066] RMDKLQKMGMSYMSCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNP
IVTEKDSPVNI
- [0067] EAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMIETTMRGAKR
- [0068] D3E 的核苷酸及氨基酸序列 (372 个核苷酸, 编码 124 个氨基酸)
- [0069] 核苷酸序列 (SEQ ID No. 6)
- [0070] AAGATGGACAAATTGAAACTCAAGGGGATGAGCTATGCAATGTGCTGAATACCTTTGTGTTGAAGAAA
GAAGTCTCCGA
- [0071] AACGCAGCATGGGACAATACTCATTAAGGTTGAGTACAAAGGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCCTTT
CTCCACGGAGG
- [0072] ATGGACAAGGGAAAGCTCACAATGGCAGACTGATCACAGCCAATCCAGTGGTGACCAAGAAGGAGGAGC
CTGTCAACATT
- [0073] GAGGCTGAACCTCCTTTTGGGGAAAGTAATATAGTAATTGGAATTGGAGACAAAGCCCTGAAAATCAAC
TGGTACAGGAA
- [0074] GGGAAAGCTCGATTGGGAAGATGTTTCGAGGCCACTGCCCGTGGTGCACGTCGT
- [0075] 氨基酸序列 (SEQ ID No. 5)
- [0076] KMDKLKLMGMSYAMCLNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQKHAHNGRLITANP
VVTKKEEPVNI
- [0077] EAEPFPGESNIVIGIGDKALKINWYRKGSSIGKMFATARGARR
- [0078] D4E 的核苷酸及氨基酸序列 (369 个核苷酸, 编码 123 个氨基酸)
- [0079] 核苷酸序列 (SEQ ID No. 8)
- [0080] CGTATGGAGAAATTGCGTATTAAGGGAATGTCATACACGATGTGCTCAGGAAAGTTCTCAATTGACAAA
GAGATGGCAGA
- [0081] AACACAGCATGGGACAACAGTGGTAAAAAGTCAAGTATGAGGGTGTGGAGCTCCATGTAAAGTTCCCAT
AGAGATAAGAG
- [0082] ATGTGAACAAGGAAAAAGTGGTAGGGCGTATCATCTCACCTACCCCTTTTGCTGAGAATACCAACAGTG
TAACCAACATA
- [0083] GAATTAGAACGCCCTTTGGACAGCTACATAGTAATAGGTGTTGGAGACAGCGCATTAACTCCATTGG
TTCAGGAAAGG
- [0084] GAGTTCCATTGGCAAGATGTTTGGAGTCCACATACCGTGGCGCAAAGCGT

[0085] 氨基酸序列 (SEQ ID No. 7)

[0086] RMEKLRIKGMSYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRIISPTP
FAENTNSVTNI

[0087] ELERPLDSYIVIGVGDSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKR

[0088] 5. 表达质粒的构建

[0089] 选择 D1E、D2E、D3E 和 D4E 测序结果正确的质粒和载体 pET22b(+) 质粒进行酶切,回收酶切产物,将经纯化的酶切片段和载体于 16℃ 连接 2 小时。表达质粒的构建示意图见图 1。

[0090] 6. 转化感受态细胞

[0091] 迅速将 20 μl 连接产物加至感受态细胞中,冰浴 30min;然后 42℃ 2min,加 1ml LB 培养基;37℃ 水浴 1hr 并不时摇动;然后将 600 μl 培养基用玻璃棒分别涂布在含 120 μg/ml 氨苄青霉素 LB 平板上;平板干燥后 37℃ 倒置过夜。

[0092] 7. DNA 提取

[0093] 从平板上挑取重组子至 2ml 含 120 μg/ml 氨苄青霉素 LB 培养基摇床过夜培养;用 QIAprep Spin miniprep Kit 提取质粒 DNA,用 PCR 和酶切鉴定片段的大小是否正确。

[0094] 8. 接种及培养

[0095] 用登革病毒 1-4 型重组质粒转化大肠杆菌 BL21 Star™(DE3),各挑取单一菌落接种到 20ml 含 120 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃ 振荡至第二天上午 8:30。各取 8ml 种子液,加 200ml 含 120 μg/ml 氨苄青霉素 LB 培养液,37℃ 180 转快摇至 OD600 为 0.6 左右,加 IPTG 至 100 μg/ml (IPTG 浓度可以优化),同时再补充一次新的氨苄青霉素至 120 μg/ml (两次共为 240 μg/ml),继续震荡培养 3-5 小时,收集菌体。

[0096] 大量发酵时,用上述方法等量发酵 1-4 型菌液,将菌液混合,超声后离心收集上清,混合蛋白经亲和层析,透析,阳离子交换和凝胶过滤等多步骤纯化。

[0097] 9、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0098] 将 1-4 型表达产物超声后离心的上清,亲和层析、阳离子交换和分子筛纯化收集的蛋白,走 SDS-PAGE 蛋白电泳。电泳图谱见图 2。图 2 中,1:蛋白标准 P7708V;2:超声后离心的上清;3:亲和层析纯化的蛋白;4:阳离子交换纯化的蛋白;5:分子筛纯化的蛋白。经过多步纯化,最后已看不出有杂带。最终得到目的蛋白大小约为 16KDa。

[0099] 10、抗原活性的初步鉴定

[0100] Western Blot (WB) 实验:将重组蛋白稀释进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶转 NC 膜,膜切成四条,取三条与登革病毒阳性血清反应,结果重组蛋白与阳性血清呈特异性反应,在约 16×103 处可见 WB 反应带,与 SDS-PAGE 重组蛋白带大小一致,健康人血清没有反应, WB 实验图谱见图 3。图 3 中, M:蛋白质 marker P7708V;1-3:WB 反应带;4:阴性对照。

[0101] 实施例二:重组抗原对登革病毒 IgG 抗体反应活性的测定

[0102] 用间接 ELISA 方法对纯化提取蛋白进行血清学检测,以确定其对登革病毒抗体阳性血清的反应性。

[0103] 将实施例一所得的抗原按 1:500、1:1000、1:2000 稀释后包被 ELISA 板,与登革阳性血清反应,确定包被抗原浓度。登革抗原的免疫活性达 1:1000。

[0104] 重组抗原按选定浓度包被,用间接法 ELISA 检测登革热病人血清 IgG 抗体,测定重

组抗原对登革病毒 IgG 抗体的反应活性。

[0105] 1. 重组抗原对 2004 年中山登革热疫情血清样本的反应活性

[0106] 1-4 型 E 蛋白重组抗原按选定浓度包被,用间接法 ELISA 检测 2004 年中山急性期、恢复期登革病人血清 IgG 抗体,30 份急性期血清(发病时间 3-13 天)有 7 份阳性(OD 值 >0.2 判为阳性,有 2 例病人发病 8 天即可检测到 IgG 抗体),17 份阴性;这 30 份血清登革病毒 IgM 抗体检测结果也是阳性。28 份恢复期血清 IgG 抗体全部阳性,13 份病后 37-60 天采的恢复期血清的 IgG 抗体水平最高,15 份病后 59-86 天采的恢复期血清 IgG 抗体水平略有下降,但仍维持在较高的水平。28 份恢复期血清 OD 值明显高于急性期血清,有 21 份 OD 值呈 4 倍以上增长,说明重组抗原能检测出病人体内 IgG 抗体水平和变化情况,对中山登革病人恢复期血清 IgG 抗体检出率达 100%,无一漏检。恢复期血清用澳大利亚 PanBio 登革试剂(Dengue IgG Capture ELISA)复查,结果也是阳性。说明 1-4 型 E 蛋白重组抗原对登革 IgG 抗体有良好的反应性,21 例病人急性期、恢复期血清登革 IgG 抗体检测结果见表 1。

[0107] 表 1 21 例病人急性期、恢复期血清登革 IgG 抗体检测结果

[0108]

病人编号	发病天数	IgG OD值	病人编号	发病天数	IgG OD值
1	5	0.06	22	82	1.26
1	37	0.82	23	5	0.05
2	6	0.07	23	80	1.21
2	38	1.56	25	9	0.79
5	5	0.02	25	60	1.97
5	42	1.3	25	86	1.88
6	10	0.63	28	5	0.049
6	54	0.85	28	78	1.42
7	5	0.04	29	8	0.18
7	71	0.5	29	53	1.14
11	6	0.053	32	8	0.07
11	73	1.3	32	74	1.75
12	5	0.103	33	6	0.044
12	72	1.3	33	57	1
13	5	0.01	33	83	1.29
13	46	1.67	34	8	0.299
15	6	0.03	34	59	1.12
15	47	1.51	34	85	0.7
15	73	1.23	35	5	0.068
19	6	0.1	35	55	1.27
19	54	1.64	35	81	1.15
19	80	1.39	36	11	0.28
21	6	0.072	36	33	1.97
21	79	1.06	36	59	1.77
22	7	0.04	Cut-off		0.2

[0109] 2. 广东省及各地级市 CDC 登革 IgG 抗体检测结果

[0110] 将实施例一所得的重组抗原制备成登革病毒 IgG 抗体检测试剂盒(以下称自研试

剂盒),分发给全省各市级 CDC(疾病预防控制中心)试用,共检测了 4288 份血清,检出 299 份阳性,在曾流行过登革热的疫区,可检出登革病毒 IgG 抗体阳性血清;广东省 CDC 检测了 1675 份血清(血清来源于虫媒病毒血清库,包括登革病人和登革监测血清)登革病毒 IgG 抗体,检出 154 份阳性,阳性率 9.19%,从 154 份登革病毒 IgG 阳性血清中选出 100 份,用澳大利亚 Panbio 登革 IgG 试剂检测,只有 2 份结果呈现阴性,98 份阳性,符合率 98%;广州市和中山市 CDC 检测了 360 份血清(多数是登革热病人急性期血清),各检出 40 份阳性,阳性率 22.22%,其它市多数采用的是正常人群监测血清,阳性率都很低,清远和梅州未出现过登革疫情,此 2 地区血清检测结果全部阴性。深圳 CDC 检测的阳性标本用进口试剂澳大利亚 PanBio 登革试剂(Dengue IgG Capture ELISA)比对结果也是阳性。说明重组抗原具有较好的特异性,结果见表 2。

[0111] 表 2 广东省和各地级市 CDC 登革 IgG 抗体检测结果

[0112]

地区	检测数	阳性数	阳性率 (%)	地区	检测数	阳性数	阳性率 (%)
广东省 CDC	1675	154	9.19	惠州	186	13	6.99
茂名	177	9	5.08	佛山	156	4	2.56
深圳	178	8	4.49	湛江	184	4	2.17
云浮	180	4	2.22	清远	193	0	0
河源	167	7	4.19	汕头	180	7	3.89
梅州	168	0	0	广州	180	40	22.22
珠海	184	4	2.17	东莞	120	4	3.33
江门	180	1	0.55	中山	180	40	22.22

[0113] 3. 对其它虫媒病毒阳性血清的检测

[0114] 用自研试剂盒检测 41 份(包括深圳市 CDC17 份)乙脑 IgG 抗体阳性血清,结果全部阴性。证明重组抗原与乙脑 IgG 抗体无交叉反应,具良好的特异性。

[0115] 上述结果表明,表达的抗原对登革 IgG 血清的反应良好。可用于研制登革病毒 IgG 抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)。

[0116] 4、对试剂的稳定性能检测

[0117] 将自研试剂盒的抗原板放入 37℃温箱,考核 6 天,检测其对热环境下的活性。检测项包括阴、阳性血清,厂内临界质控血清,其结果与 4℃条件下保存的抗原板所检测的结果比较,抗原活性下降未超过 25%。

[0118] 5. 干扰检测

[0119] - 用自研试剂盒检测高血酯、高胆红素、高血红蛋白、黄疸和抗凝剂处理(EDTA、枸橼酸钠)的血浆样本,检测结果全部为阴性。说明这些血清对 Dengue IgG 的检测无明显干

扰。对同属黄病毒科的 HCV 阳性血清无明显交叉反应,特异性好。

[0120] 实施例三:本发明所述的登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒的生产工艺

[0121] (一) 材料

[0122] 1. 登革抗原:制备见实施例一。所述抗原 1:1000 包被时,对厂内参比品阳性符合率达到 98%,特异性达到 97%。

[0123] 2. 羊抗人 IgG-HRP:深圳瑞桑公司产品。

[0124] 3. TMB:德国柏林格产品。

[0125] 4. 阳性对照血清:所述的阳性对照血清是在含 20%山羊血清和 0.02%叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,加入确定浓度的阳性血清制成,阳性对照的 A 值应大于 1.5。

[0126] 5. 阴性对照血清:阴性对照血清是在含 20%山羊血清和 0.02%叠氮钠的 10mM 的 pH7.4 的 PBS 中,按 5%的比例加入混合好的阴性血清制成。阴性对照的 A 值应小于 0.1。

[0127] 6. 酶标板:12 孔板条, CV(%) ≤ 10%。可采用深圳金灿华有限公司的产品。

[0128] 7. 厂内参比品:自广东省疾病预防控制中心微检所虫媒病研究室的血清库中筛选和制备。

[0129] 8. 山羊血清:购自浙江三利生物制品厂,蛋白含量为 3.3±0.5%,无菌试验阴性,对试剂盒反应系统无抑制。

[0130] 9. 其它试剂:均为国产分析纯试剂。

[0131] (二) 制备过程

[0132] 1. 抗原制备及检定(见实施例一至二)

[0133] 2. 包被工艺的确定

[0134] (1) 固相载体的筛选

[0135] CV 值测定:包被后取 1 份 Dengue-IgG 弱阳性血清(CV 血清)用间接法测定 10 孔 CV 值;

[0136] 吸附性测定:取自制 Dengue 基因工程抗原自 1:250 开始对倍稀释包被,取 1 份 Dengue-IgG 阳性血清用间接法测定,观察 OD>0.5 的孔序。

[0137] (2) 封闭条件的选择

[0138] 选择现有的多种封闭液配方进行试验,最后选定用含 20%山羊血清和 0.02%叠氮钠的 10mM PBS(pH7.4), 150u1/孔封闭,4℃过夜后扣干。

[0139] (3) 包被板制备

[0140] 将所述的基因工程重组表达的登革病毒包膜蛋白特异性抗原按确定的浓度用 0.05M 的 pH9.6 的 CB 即碳酸盐缓冲液稀释后,按 0.1ml/孔包被到微孔板内,在 2℃~8℃吸附 24~26 小时后,用 10mM PBST 即吐温磷酸缓冲液按 0.25ml/孔洗板,再用封闭液按 0.15ml/孔在 2℃~8℃封闭 18~20 小时,弃除多余的封闭液,经真空干燥处理后用铝膜袋密封,置 2~8℃保存。

[0141] 3、酶标抗体稀释液的选择及效价滴定

[0142] 采用经筛选的酶标稀释液(pH7.4 的 10mM PBS,含 10%山羊血清和 0.2%吐温-20、0.2% Bronidox),按工作浓度配制羊抗人 IgG-HRP 工作液,其稳定性符合质检要求。经滴定,羊抗人 IgG-HRP 的效价为 1:10000。

[0143] 4、cut-off 值的确定

Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu Arg Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu
 50 55 60

Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile
 65 70 75 80

Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly
 85 90 95

Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly
 100 105 110

Lys Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg
 115 120

[0161] <210>2

[0162] <211>372

[0163] <212>DNA

[0164] <213> 登革病毒 1 型 E 蛋白 B 区

[0165] <400>2

[0166]

aaaatggaca aactgactct aaaagggatg tcatatgtta tgtgcacagg ctcattcaag 60

ctagagaaag aagtggctga gaccaacat ggaaccgttc tagtgcagat taaatacgaa 120

ggaacagatg caccatgcaa gatecctttt tcgacccaag atgaaagagg agtaaccag 180

aacgggagat taataacage caaccctata gttactgaca aagaaaaacc agtcaacatt 240

[0167]

gaggcagaac caccttttgg tgagagttac atcgtgatag gagcaggtga aaaagctttg 300

aaactaagtt ggttcaagaa aggaagcagc atagggaaaa tgtttgaggc gactgcccgt 360

ggtgcacgtc gt 372

[0168] <210>3

[0169] <211>124

[0170] <212>PRT

[0171] <213> 登革病毒 2 型 E 蛋白 B 区

[0172] <400>3

[0173]

Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr

1 5 10 15

Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr

 20 25 30

Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile

 35 40 45

Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu

 50 55 60

Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile

65 70 75 80

[0174]

Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu
 85 90 95

Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly
 100 105 110

Gln Met Ile Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg
 115 120

[0175] <210>4

[0176] <211>372

[0177] <212>DNA

[0178] <213> 登革病毒 2 型 E 蛋白 B 区

[0179] <400>4

[0180]

cgtatggaca aactacagct caaaggaatg tcatactcta tgtgcacagg aaagtttaaa 60

gttgigaagg aatagcaga aacacaacat ggaacaatag ttatcagagt acaatatgaa 120

ggggacgggtt ctccatgtaa gatccctttt gagataatgg atttgaaaa aagacatggt 180

ttaggtcgcc tgattacagt caaccaatc gtaacagaaa aagatagccc agtcaacata 240

gaagcagaac ctccattcgg agacagctac atcatcatag gagtagagcc gggacaattg 300

aagctcaact ggtttaagaa aggaagttct atcggccaaa tgattgagac aacaatgcgt 360

ggtgcgaagc gt 372

[0181] <210>5

[0182] <211>124

[0183] <212>PRT

[0184] <213> 登革病毒 3 型 E 蛋白 B 区

[0185] <400>5

[0186]

aagatggaca aattgaaact caaggggatg agctatgcaa tgtgcttgaa tacctttgtg	60
ttgaagaaag aagtctccga aacgcagcat gggacaatac tcattaaggt tgagtacaaa	120
ggggaagatg caccctgcaa gattcctttc tccacggagg atggacaagg gaaagctcac	180
aatggcagac tgatcacagc caatccagtg gtgaccaaga aggaggagcc tgtcaacatt	240
gaggctgaac ctccttttgg ggaaagtaat atagtaattg gaattggaga caaagccctg	300
aaaatcaact ggtacaggaa gggaaagctcg attgggaaga tgttcgaggc cactgcccgt	360
ggtgcacgtc gt	372
[0194] <210>7	
[0195] <211>123	
[0196] <212>PRT	
[0197] <213> 登革病毒 4 型 E 蛋白 B 区	
[0198] <400>7	
[0199]	

cgtatggaga aattgcgtat taagggaatg tcatacacga tgtgctcagg aaagttctca	60
attgacaaag agatggcaga aacacagcat gggacaacag tggtaaaagt caagtatgag	120
ggtgctggag ctccatgtaa agttcccata gagataagag atgtgaacaa ggaaaaagtg	180
gtagggcgta tcatctcacc taccctttt gctgagaata ccaacagtgt aaccaacata	240
gaattagaac gccctttgga cagctacata gtaatagtg ttggagacag cgcattaaca	300
ctccattggt tcaggaaagg gaggttccatt ggcaagatgt ttgagtccac ataccgtggc	360
gcaaagcgt	369
[0206] <210>9	
[0207] <211>30	
[0208] <212>DNA	
[0209] <213> 人工合成引物	
[0210] <400>9	
[0211]	
ggaggaattc aaaatggaca aactgactct	30
[0212] <210>10	
[0213] <211>35	
[0214] <212>DNA	
[0215] <213> 人工合成引物	
[0216] <400>10	
[0217]	
cccacctcga gacgacgtgc accacgggca gtcgc	35
[0218] <210>11	
[0219] <211>30	
[0220] <212>DNA	
[0221] <213> 人工合成引物	
[0222] <400>11	
[0223]	
ggaggaattc cgtatggaca aactacagct	30
[0224] <210>12	

[0225]	<211>35	
[0226]	<212>DNA	
[0227]	<213> 人工合成引物	
[0228]	<400>12	
[0229]		
	cccacctega gacgcttegc accacgcatt gttgt	35
[0230]	<210>13	
[0231]	<211>30	
[0232]	<212>DNA	
[0233]	<213> 人工合成引物	
[0234]	<400>13	
[0235]		
	ggaggaattc aagatggaca aattgaaact	30
[0236]	<210>14	
[0237]	<211>35	
[0238]	<212>DNA	
[0239]	<213> 人工合成引物	
[0240]	<400>14	
[0241]		
	cccacctega gacgacgtgc accacgggca gtggc	35
[0242]	<210>15	
[0243]	<211>35	
[0244]	<212>DNA	
[0245]	<213> 人工合成引物	
[0246]	<400>15	
[0247]		
	ggaggaattc cgtatggaga aattgcgtat taagg	35
[0248]	<210>16	
[0249]	<211>35	
[0250]	<212>DNA	
[0251]	<213> 人工合成引物	
[0252]	<400>16	
[0253]		
	cccacctega gacgctttgc gccacggtat gtgga	35

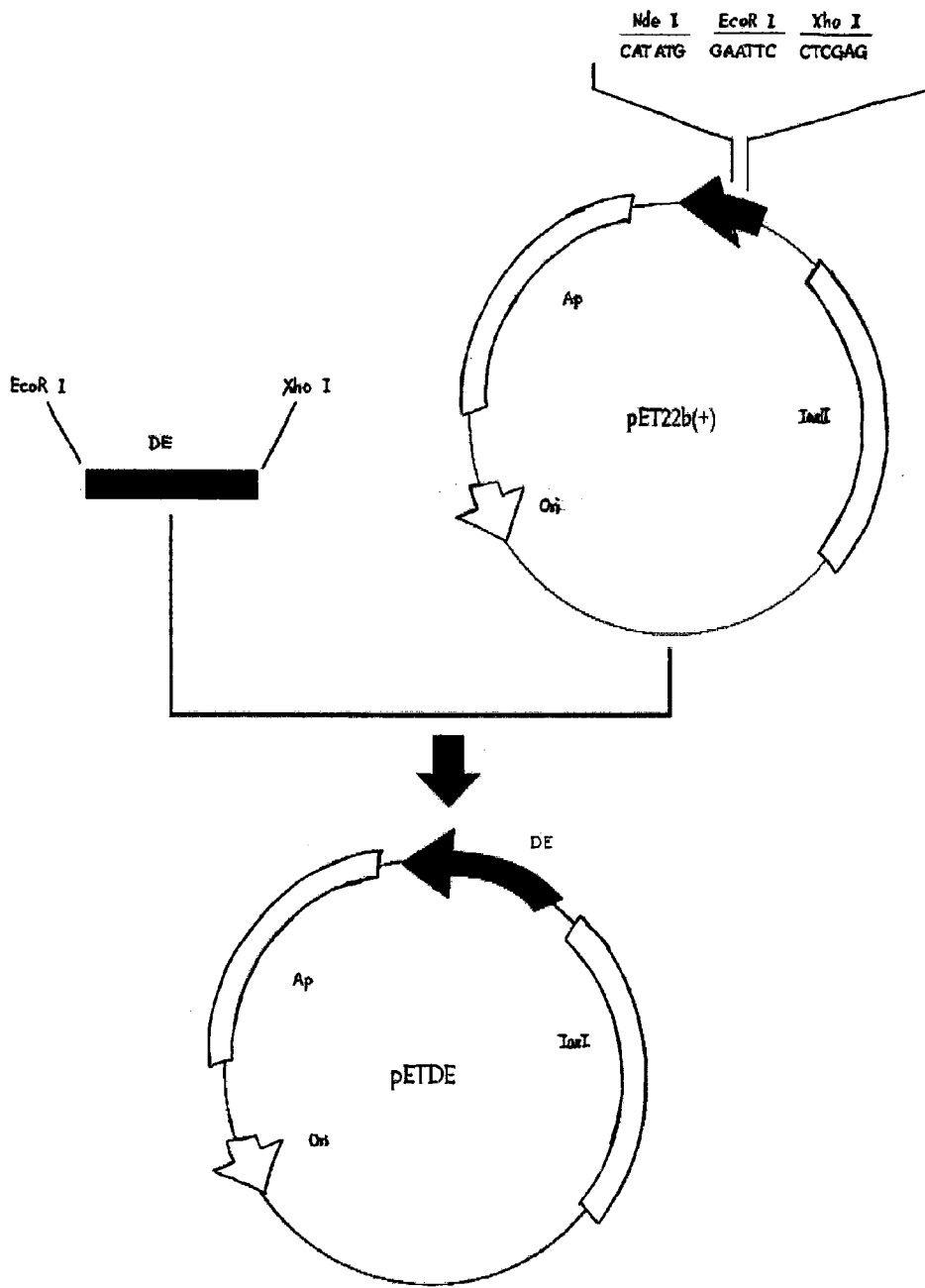


图 1

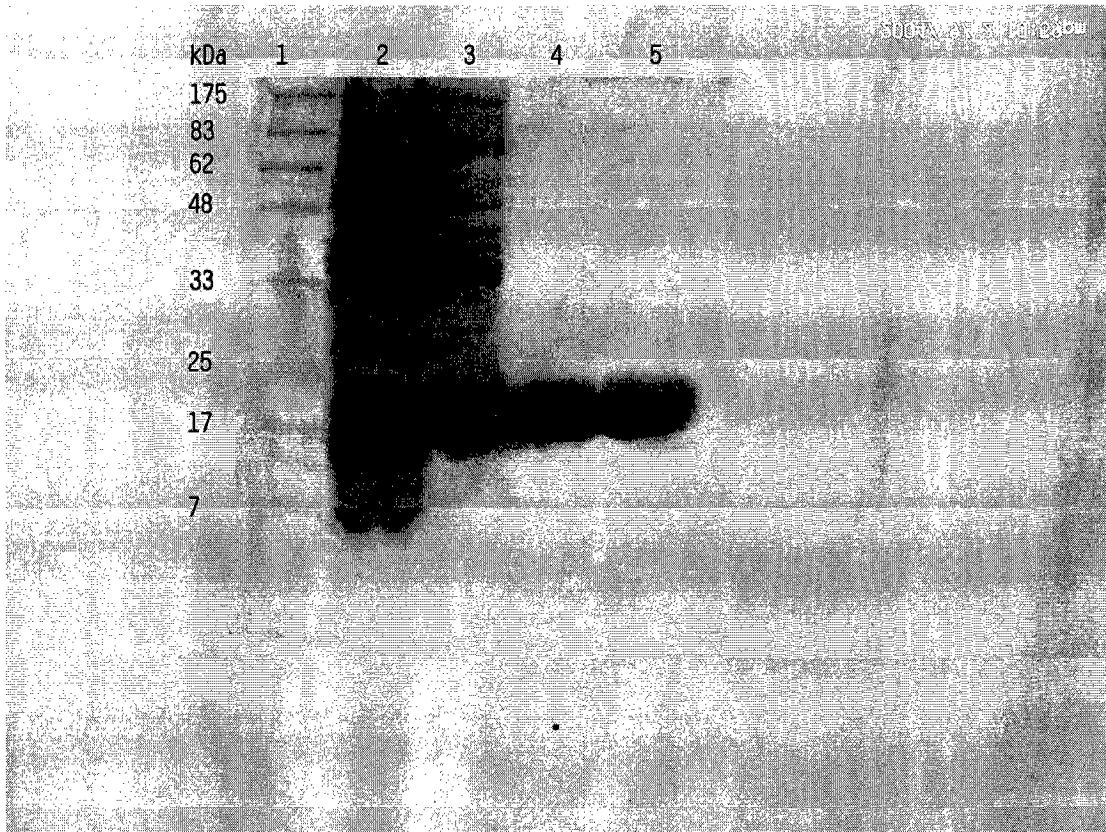


图 2

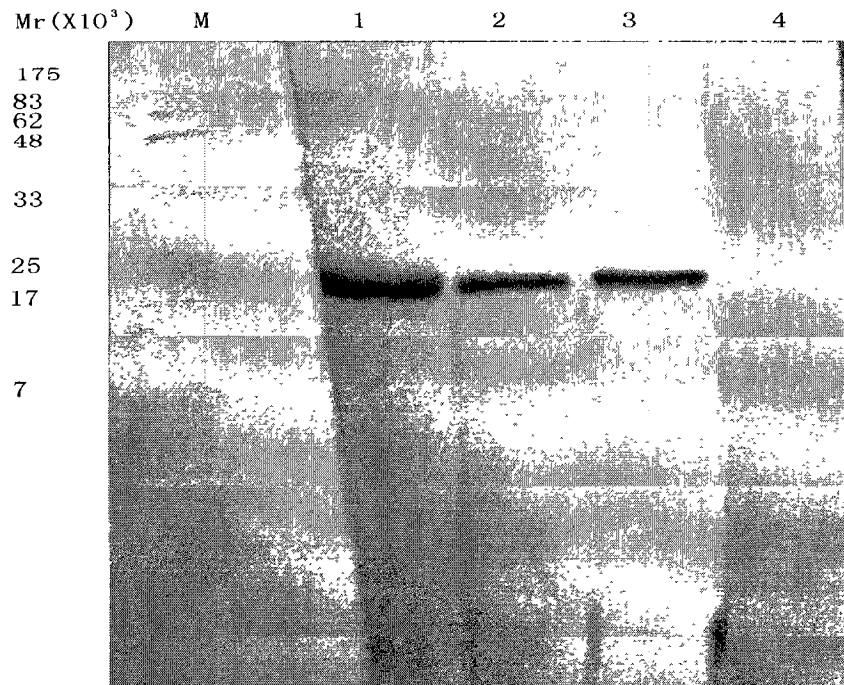


图 3

专利名称(译)	登革病毒IgG抗体酶联免疫诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN101308137B	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN200710028003.6	申请日	2007-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	广东省疾病预防控制中心		
[标]发明人	江立敏 周惠琼 郑夔 柯昌文		
发明人	江立敏 周惠琼 郑夔 柯昌文		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	Y02A50/53		
其他公开文献	CN101308137A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种登革病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒。本发明所述的试剂盒包括酶标记板、阴性对照血清、阳性对照血清、酶标记物、样品稀释液、浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、封板胶，所述酶标记物包含羊抗人IgG-HRP；所述酶标记板上的包被抗原包括：氨基酸序列为SEQ ID No.1的重组1型登革病毒包膜蛋白特异性抗原；氨基酸序列为SEQ ID No.3的重组2型登革病毒包膜蛋白特异性抗原；氨基酸序列为SEQ ID No.5的重组3型登革病毒包膜蛋白特异性抗原；氨基酸序列为SEQ ID No.7的重组4型登革病毒包膜蛋白特异性抗原。通过检测血清中登革病毒IgG抗体，可对二次或以上多次感染登革热的病人进行早期诊断和对健康人群的血清流行病学调查。并可对初次感染登革热的病人进行最后确诊。

